



**University of
Zurich^{UZH}**

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
University Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2015

Virusreplikation im Laserlicht

Fraefel, Cornel

Abstract: Wegen ihrer geringen Grösse wurden Viren erst vor etwas mehr als hundert Jahren als eigenständige biologische Einheiten erkannt. Die Erforschung der Viren auf molekularer Ebene wurde sogar erst mit der Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologie in den 1970er-Jahren möglich. Ein weiterer sehr wichtiger Fortschritt war die Entdeckung und Isolation eines kleinen Proteins der Qualle *Aequorea victoria*, das die besondere Eigenschaft hat, grün zu fluoreszieren, wenn es mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird. Dieses Protein erlaubt es nämlich zum ersten Mal, die räumliche und zeitliche Organisation der Virusreplikation in lebenden Zellen zu beobachten.

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-111300>

Journal Article

Published Version

Originally published at:

Fraefel, Cornel (2015). Virusreplikation im Laserlicht. Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich, 160(2):4-7.

Virusreplikation im Laserlicht

Wegen ihrer geringen Grösse wurden Viren erst vor etwas mehr als hundert Jahren als eigenständige biologische Einheiten erkannt. Die Erforschung der Viren auf molekularer Ebene wurde sogar erst mit der Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologie in den 1970er-Jahren möglich. Ein weiterer sehr wichtiger Fortschritt war die Entdeckung und Isolation eines kleinen Proteins der Qualle *Aequorea victoria*, das die besondere Eigenschaft hat, grün zu fluoreszieren, wenn es mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird. Dieses Protein erlaubt es nämlich zum ersten Mal, die räumliche und zeitliche Organisation der Virusreplikation in lebenden Zellen zu beobachten.

Im Jahr 2008 erhielten Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien für die Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) den Nobelpreis für Chemie. GFP ist ein Protein von 238 Aminosäuren Länge, das aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Shimomura et al., 1962). Seine Besonderheit liegt darin, dass es bei Anregung mit Licht bestimmter Wellenlängen grün fluoresziert. Da das Protein substratunabhängig ist, kann die GFP-Fluoreszenz auch in lebenden Zellen nachgewiesen werden. GFP kann mit den meisten anderen Proteinen fusioniert werden, ohne deren Funktion und intrazelluläre Verteilung zu beeinträchtigen. Dies ermöglicht die räumliche und zeitliche In-vivo-Beobachtung von biologischen Prozessen.

Durch die Einführung von gezielten Mutationen in der GFP-Primärstruktur konnten Varianten erzeugt werden, die blau (*cyan fluorescent protein*,

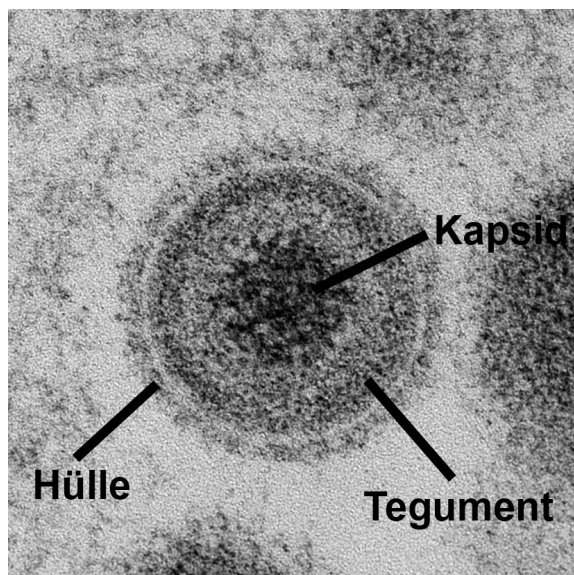
CFP) oder gelb (*yellow fluorescent protein*, YFP) fluoreszieren. Mit der Entdeckung von rot fluoreszierenden Proteinen in Korallen konnte das Farbspektrum der auto-fluoreszierenden Proteine noch zusätzlich erweitert werden. So lassen sich nun die Interaktionen von mehreren an einem Mechanismus beteiligten Proteinen simultan in verschiedenen Farben beobachten. Auto-fluoreszierende Proteine haben nicht nur in der Zellbiologie, sondern auch in allen anderen Sparten der biomedizinischen Forschung, einschliesslich der Virusforschung, immens zu unserem Erkenntnisgewinn beigetragen.

Frühe Massnahmen gegen Viruskrankheiten

Viren sind kleine intrazelluläre Parasiten, die aus Nukleinsäure, Protein und in manchen Fällen Lipid bestehen. Viruskrankheiten sowie Massnahmen, sich davor zu schützen, waren schon vor mehr als 1000 Jahren bekannt. In China wurde bereits im 11. Jh. die sogenannte Variolation praktiziert, bei welcher gesunde Menschen mit Material aus den Wunden von Pockenkranken inokuliert wurden.

Die Massnahme resultierte aus der Erkenntnis, dass Individuen, welche die Pockenkrankheit überlebten, vor weiteren Pockeninfektionen geschützt waren. Dabei handelte es sich aus heutiger

→ Abbildung 1: Elektronenmikroskop-Aufnahme eines *Herpes simplex* Virus Partikels. *Herpes simplex* Viren haben einen Durchmesser von 200 bis 300 Nanometern und bestehen aus mehreren Schichten: einer Lipidmembranhülle, einem Tegument und einer Proteinhülle (Kapsid), welche das doppelsträngige DNA Genom umschliesst.



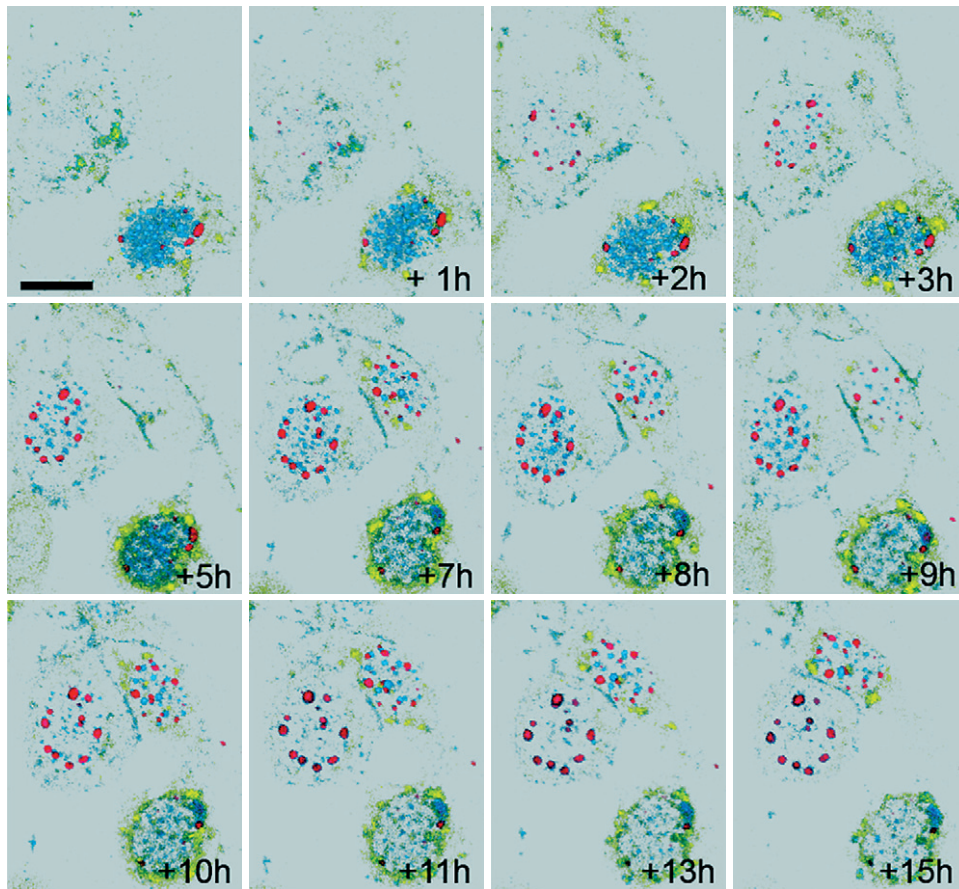


Abbildung 2: Multifluoreszenz Live-Analyse der *Herpes simplex* Virus Replikation. Die konfokale Laser-scanning Mikroskopie von Zellen, die mit HSV infiziert wurden, zeigt die Dynamik und die Interaktion der drei HSV-Kompartimente: Kapsid (rot), Tegument (blau) und Lipidhülle (gelb). Das erste Bild wurde 4 Stunden nach der Infektion aufgenommen, die weiteren Aufnahmen erfolgten nach den angegebenen Zeitintervallen von +1h bis +15h. Grössenreferenz: 10 Mikrometer.

Sicht um eine sogenannte attenuierte Lebendvaccine, welche durch Mobilisation des Immunsystems zu einem Schutz der Inokulierten führte.

Späte Entdeckung der Viren

Im späten 18. Jh. wurde die Variolation, welche oft fatale Folgen hatte, durch die viel weniger gefährliche Vakzinierung abgelöst. Diese Strategie resultierte aus der Beobachtung des englischen Arztes Edward Jenner, dass Melkerinnen, die Symptome einer milden Kuhpockeninfektion gezeigt hatten, vor der humanen Pockenkrankheit geschützt waren. Diese Erkenntnis setzte auch den Grundstein für die Entwicklung der modernen Vakzinen und ist wegen der Tatsache, dass bis zur eigentlichen Entdeckung der Viren noch über 100 Jahre vergehen sollten, umso bemerkenswerter. Um 1898 beobachtete Martinus Beijerinck, dass das Pathogen, das die Mosaik-Krank-

heit bei Tabakpflanzen verursacht, Bakterienfilter passieren kann. Er folgerte daraus, dass der Erreger demnach viel kleiner ist als alle bekannten Bakterien und eine unabhängige biologische Einheit sein muss. Aber erst die Einführung der Elektronenmikroskopie ca. 30 Jahre später ermöglichte schliesslich die direkte Sichtbarmachung von Viren.

In den darauffolgenden Jahrzehnten wurden sehr viele Viren entdeckt und mit indirekten Nachweismethoden erforscht, wobei der Erkenntnisgewinn immer parallel verlief zu der technischen Entwicklung. Die rekombinante DNA-Technologie verhalf auch der Virusforschung zu einem eigentlichen Durchbruch, da es nun möglich wurde, virale Genome gezielt zu verändern, die Funktion der viralen Proteine und deren Interaktion mit der Zelle aufzuklären und Viren als Vakzinen oder Vektoren für die Gentherapie zu verwenden. Die Werkzeuge

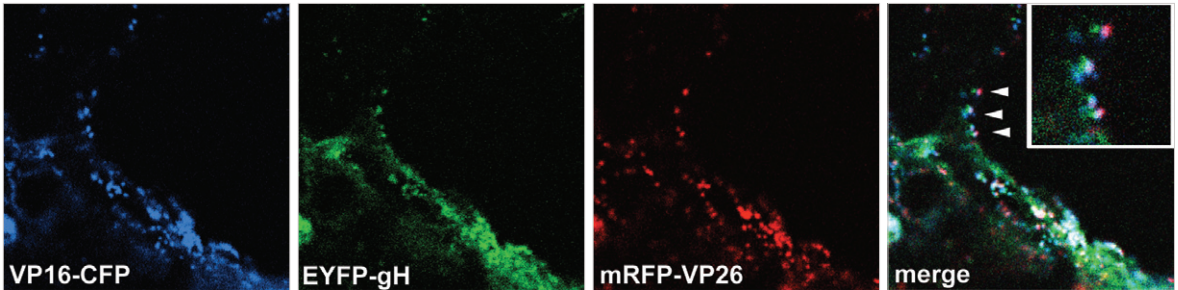


Abbildung 3: Herpesviren an der Plasmamembran. Spät in der Infektion akkumulieren Kapsid- (rot), Tegument- (blau) und Hüllproteine (grün*) an der Zytoplasmamembran und erscheinen bei Kolo-kalisation als weisse Punkte (Pfeile), welche möglicherweise einzelne Viruspartikel repräsentieren. (*Das Hüllprotein ist zwar mit einem gelb-fluoreszierenden Protein fusioniert, die konfokalen Aufnahmen wurden aber in dieser Abbildung grün eingefärbt.)

der rekombinanten DNA-Technologie und die Verfügbarkeit von auto-fluoreszierenden Proteinen erlaubte schliesslich die Untersuchung der einzelnen Schritte des viralen Replikationszyklus in lebenden Zellen. Ein kleines Spektrum der daraus hervorgehenden Möglichkeiten für die Virusforschung soll anhand der folgenden Beispiele illustriert werden.

Herpesvirus-Replikation in Echtzeit

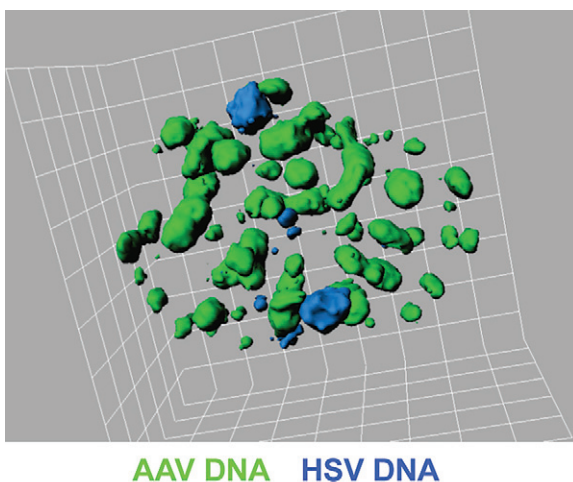
Herpesviren bestehen aus einer Lipidmembranhülle und einer Proteinhülle (Kapsid), die das DNA-Genom einschliesst. Der Raum zwischen Kapsid und Lipidmembran wird Tegument genannt und enthält viele verschiedene Virusproteine (Abbildung 1). Die Lipidmembran enthält virale Glykoproteine, welche die Bindung an und die Penetration in die Zelle ermöglichen.

Nach dem Zelleintritt wird das Kapsid entlang des Zytoskeletts zum Zellkern transportiert,

wo das virale Genom durch die Kernporen ins Kern-lumen eintreten kann. Im Zellkern findet dann mit-hilfe der zellulären Makromolekülsynthese-Ma-schinerie die Transkription der Virusgene und die Replikation der Virus DNA statt. Die Virusproteine werden im Zytoplasma synthetisiert und für den Zu-sammenbau der Nachkommenviren in die entspre-chenden zellulären Kompartimente transportiert: Kapsidproteine in den Zellkern, wo die Verpackung der viralen DNA stattfindet, und Glykoproteine an die zellulären Membranen, um den Zellaustritt der neu synthetisierten Viren zu ermöglichen.

Um die Dynamik des Replikationszyklus auf-zuzeichnen, hat unsere Forschungsgruppe ein *Her-pes simplex* Virus (HSV) konstruiert, das je ein Pro-tein aus den drei verschiedenen Virusstrukturen – Membranhülle, Tegument und Kapsid – als Fusi-onsprotein mit einem gelb, blau und rot fluores-zierenden Protein kodiert.

Die konfokale Laser-scanning-Mikroskopie von Zellen, die mit diesem rekombinanten Herpes-virus infiziert wurden, erlaubte zum ersten Mal eine vierdimensionale Analyse der Interaktionen zwis-chen den verschiedenen HSV-Strukturen während der Replikation des viralen Genoms und dem Zu-sammenbau der Viruspartikel in einer lebenden Zelle (Abbildung 2; de Oliveira et al., 2008): Im Zellkern bilden die blau fluoreszierenden Tegumentproteine und die rot fluoreszierenden Kapsidproteine sepa-



← Abbildung 4: AAV und sein Helfervirus HSV bilden separate und kompetitive Replikations-kompartimente im Zellkern, wie die gleichzeitige Visualisierung von AAV- (grün) und HSV Replikationskompartimenten (blau) im Kern einer ko-infizierten Zelle zeigt.

rate Foci, die mit der Zeit grösser werden und jene Kompartimente repräsentieren, in welchen die Replikation des viralen Genoms respektive der Zusammenbau der Viruskapside stattfinden.

Das gelb fluoreszierende Membranprotein wird in die zellulären Membranen eingelagert, um den Einschluss der Kapside in eine Lipidmembranhülle und den Austritt der neusynthetisierten HSV Partikel aus der Zelle vorzubereiten. Spät in der Infektion akkumulieren auto-fluoreszierende Punkte an der Zytoplasmamembran. Die Hypothese, dass es sich bei diesen Punkten um einzelne aus der Zelle austretende Viruspartikel handelt, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass deren Anzahl spät in der Infektion zunimmt und die Fluoreszenzfarben gelb, blau und rot, welche die drei verschiedenen Virusstrukturen repräsentieren, oft am gleichen Ort zu finden sind (Abbildung 3).

Konkurrenz sichtbar gemacht

Durch Fusionieren von auto-fluoreszierenden Proteinen mit Nukleinsäure-Bindungsproteinen lässt sich auch die Synthese des viralen Genoms in lebenden Zellen sichtbar machen. So ist es uns gelungen, die Replikation des Genoms des Adeno-assoziierten Virus (AAV) in lebenden Zellen zu beobachten. AAV ist ein von einem Helfervirus abhängiges Parvovirus, dessen Replikation nur bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Adeno-, Papilloma- oder Herpesvirus (z.B. HSV) in der Zelle stattfinden kann.

Für die Visualisierung der AAV-Genomreplikation in lebenden Zellen wurde ein Protein, das spezifisch an die DNA des AAV bindet, mit einem gelb fluoreszierenden Protein fusioniert. Um gleichzeitig die Replikation des Helfervirus Genoms zu visualisieren, wurde ein Protein, das spezifisch an die HSV-DNA bindet, mit einem blau fluoreszierenden Protein fusioniert.

Mithilfe dieser zwei Fusionsproteine kann man die replizierende AAV- und HSV-DNA im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen, weil die Anzahl der Bindungsstellen für die auto-fluoreszierenden, virusspezifischen DNA-Bindungsproteine linear mit der Anzahl der viralen Genomkopien zunimmt. Diese Untersuchungen zeigten, dass die zwei verschiedenen Viren im Zellkern separate Kompartimente bilden, in denen die Genomreplikation stattfindet, und dass AAV die Replikation des genetisch viel komplexeren HSV effizient behindern kann

und sich so einen kompetitiven Vorteil verschafft (Abbildung 4; Glauser et al., 2007).

Vielseitige Anwendungen

Die Anwendungsmöglichkeiten der auto-fluoreszierenden Proteine in der Virusforschung sind vielseitig. Die Interaktionen zwischen Virus und Wirt können sowohl auf der molekularen als auch auf der makromolekularen Ebene analysiert werden. Der Transport von einzelnen Viruspartikeln im Zytoplasma oder im Axon einer Nervenzelle lassen sich genauso dynamisch aufzeichnen wie die Ausbreitung einer Virusinfektion in einer experimentell infizierten Maus. Neben der Fluoreszenz- und konfokalen Laser-scanning-Mikroskopie steht auch In-vivo-Biolumineszenz-Bildgebung sowie Durchflusszytometrie für die Datenanalyse zur Verfügung.

Ein kleines Protein aus einer unscheinbaren Qualle vermochte also bereits viel Licht in die Geheimnisse des Replikationszyklus vieler Viren zu werfen; viele weitere faszinierende Erkenntnisse werden folgen.

Cornel Fraefel

Der Autor ist Professor für experimentelle Virologie an der Universität Zürich.

LITERATUR

- Shimomura O., Johnson F.H. und Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiology* 59:223-239
- de Oliveira A.P., Glauser D.L., Laimbacher A.S., Strasser R., Schraner E.M., Wild P., Ziegler U., Breakefield X.O., Ackermann M., Fraefel C. 2008. Live visualization of herpes simplex virus type 1 compartment dynamics. *J Virol.* 82:4974-4990
- Glauser D.L., Strasser R., Laimbacher A.S., Saydam O., Clément N., Linden R.M., Ackermann M., Fraefel C. 2007. Live covisualization of competing adeno-associated virus and herpes simplex virus type 1 DNA replication: molecular mechanisms of interaction. *J Virol.* 81:4732-4743